Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 13, No. 5, Dec- Jan 2018, p. 744-758

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 13، شماره 5، آذر - دی 1396، ص. 758-744

بهینه‌سازی شرایط تشکیل کونژوگه‌های حاصل از پروتئین‌های شیر با بخش محلول صمغ‌های بومی ایرانی (صمغ فارسی و کتیرا)

فاطمه آذری کیا[1]- سلیمان عباسی[2*]

تاریخ دریافت: 1395/01/31
تاریخ پذیرش: 1395/07/22

چکیده

واکنش میلارد یک روش شناخته شده جهت ایجاد اتصال کوالانسی بین پروتئین‌ها و بسیارقندی‌ها می‌باشد که به‌منظور بهبود ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌ها استفاده می‌شود. بنابراین، هدف از پژوهش حاضر بهینه‌سازی تولید کونژوگه‌های پروتئین‌های شیر–بخش محلول صمغ‌های بومی با استفاده از روش سطح پاسخ و کاربرد آن‌ها به‌منظور افزایش پایداری امولسیون‌های آب در روغن بود. برای تولید کونژوگه‌های پروتئین– بسیارقندی، حرارت‌دهی به روش خشک (دمای 60 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی 79 درصد) انجام شد و تاثیر هم‌زمان نسبت پروتئین:بسیارقندی و زمان حرارت‌دهی بر متغییرهای وابسته (میزان جایگزینی آمین آزاد و تغییر رنگ) بررسی گردید. به‌علاوه، جهت بررسی امکان بهبود پایداری امولسیون‌ها با استفاده از کونژوگه‌های حاصل، روغن آفتابگردان (4 درصد وزنی/ وزنی) به محلول کونژوگه پروتئین–بسیارقندی (0/4 درصد وزنی/ وزنی) افزوده شده و همگن‌سازی توسط امواج فراصوت انجام شد. طبق نتایج به‌دست آمده، شرایط بهینه از لحاظ زمان حرارت‌دهی و نسبت پروتئین: بسیارقندی در روش میلارد خشک به‌ترتیب برای ایزوله پروتئین‌های سرمی–بخش محلول صمغ فارسی 8 روز و 1/59:1، برای کازئینات سدیم–بخش محلول صمغ فارسی 7 ساعت و 2:1، برای ایزوله پروتئین‌های سرمی–بخش محلول صمغ کتیرا 13/64 روز و 3:1 و برای کازئینات سدیم–بخش محلول صمغ کتیرا 7/82 ساعت و 3:1 بود. نتایج این تحقیق نشان دادند که صمغ فارسی در مقایسه با صمغ کتیرا توانایی بیشتری در ایجاد اتصال کوالانسی با پروتئین‌های شیر داشت. هم‌چنین، اتصال پروتئین به بخش محلول صمغ‌های بومی نه تنها منجر به پایداری کامل امولسیون‌ها نشد، بلکه سبب کاهش کارایی پروتئین‌ها در پایداری امولسیون‌ها شد.

واژه‌های کلیدی: پروتئین‌های شیر، واکنش میلارد، کتیرا، صمغ فارسی

مقدمه

واکنش میلارد واکنش شیمیایی است که بین گروه آمین آزاد پروتئین (معمولا گروه ε-آمینو لیزین و نیز گروه α-آمینو اسیدهای انتهایی) با گروه کربوکسیل انتهایی بسیارقندی[3] اتفاق می‌افتد. تشکیل کونژوگه پروتئین–بسیارقندی (گلیکوپروتئین) براساس تشکیل باز شیف (با آزاد کردن یک مولکول آب) و تغییر آرایش آمادوری طی واکنش میلارد استوار است. در این واکنش چندین متغیر مانند دما، زمان، pH، فعالیت آبی، ویژگی‌های ذاتی پروتئین و قند (تک‌قندی، دوقندی و بسیارقندی) و نیز نسبت گروه آمین به قند احیاکننده در بازدهی و نوع محصول واکنش میلارد تاثیرگذار هستند که در نهایت در ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، ساختار و عملکردی پروتئین‌های اصلاح شده موثرند (Liu *et al*., 2012; Kato, 2002). مطالعات نشان داده‌اند که ایجاد گلیکوپروتئین منجر به افزایش حلالیت پروتئین‌ها، افزایش مقاومت حرارتی آن‌ها، افزایش ویژگی امولسیون‌کنندگی، افزایش ویژگی کف‌کنندگی، افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی، افزایش فعالیت ضدمیکروبی و بهبود ویژگی‌های بافتی می‌شود (Liu *et al*., 2012).

برای ایجاد پیوند کوالانسی با استفاده از واکنش میلارد بین پروتئین و بسیارقندی‌ها دو روش وجود دارد: واکنش به روش خشک[4] و واکنش به روش مرطوب[5]. روش خشک امروزه برای ایجاد اتصال کوالانسی بین پروتئین‌ها و بسیارقندی‌ها به‌طور متداول استفاده می‌شود. برای تهیه کونژوگه پروتئین– بسیارقندی با این روش محلول هر یک از بسپارهای زیستی تهیه شده و به نسبت‌های مختلفی با یکدیگر مخلوط شده و با روش خشک کردن انجمادی به پودر تبدیل می‌شود. پودر حاصل در رطوبت نسبی 79 درصد معمولا

1 و 2- به‌ترتیب دانش‌آموخته دکتری و استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران.
(* - نویسنده مسئول (Email: sabbasifood@modares.ac.ir
DOI: 10.22067/ifstrj.v1395i0.55259
3 Polysaccharide

4 Dry reaction
5 Wet reaction

در دمای 60 درجه سانتی‌گراد برای مدت مشخصی حرارت می‌بینند. لازم به ذکر است که مدت زمان لازم برای ایجاد واکنش میلارد به ساختار پروتئین بستگی دارد (O'Regan *et al*., 2009; Kato, 2002). به‌علاوه، در واکنش میلارد امکان کاهش زمان واکنش با افزایش دما وجود دارد (Akhtar *et al*., 2003).

همان‌گونه که اشاره شد یکی از مزایای اتصال بسیارقندی‌ها به پروتئین‌ها افزایش ویژگی امولسیون‌کنندگی پروتئین‌هاست. این بسپارهای زیستی، به‌عنوان مولکول‌های دارای دو سر قطبی، به‌طور وسیعی در صنایع غذایی به‌عنوان امولسیون‌کننده مورد استفاده قرار می‌گیرند؛ اما، تغییر شرایط محیطی مانند تغییر pH، دما، قدرت یونی و انجماد–انجمادزدایی می‌تواند پایداری امولسیون‌های بر پایه پروتئین را تحت تاثیر قرار دهد. لذا، به واسطه واکنش میلارد می‌توان بسیارقندی‌هایی را که بیشتر آن‌ها به علت عدم برخورداری از فعالیت سطحی مناسب فاقد ویژگی امولسیون‌کنندگی هستند را به مولکول‌های پروتئین متصل نمود تا به‌واسطه این مولکول‌ها در سطح مشترک روغن و آب قرار گیرند و با افزایش ضخامت لایه بین سطحی و در برخی موارد با افزایش دافعه الکترواستاتیک سبب افزایش پایداری سامانه‌های امولسیونی شوند (McClements, 2005).

تاکنون از پروتئین‌ها و بسیارقندی‌های متعددی به‌منظور ایجاد کونژوگه پروتئین–بسیارقندی به‌منظور افزایش ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی پروتئین‌ها استفاده شده است، به‌عنوان مثال از: ایزوله پروتئین‌های سرمی و دکستران (Akhtar *et al*., 2003)، ایزوله پروتئین‌های سرمی و پکتین (Xu *et al*., 2012)، بتا-لاکتوگلوبولین–دکستران (Wooster *et al*., 2006)، پروتئین گندم دآمیده شده و گلوکز یا مالتودکسترین (Wong *et al*., 2011)، کازئینات سدیم–مالتودکسترین (O'Regan *et al*., 2009)، صمغ فیبر ذرت و بتا-لاکتوگلوبولین و یا ایزوله پروتئین‌های سرمی (Yadav *et al*., 2010)، پروتئین‌های آب پنیر و نشاسته (صادقیان و همکاران، 1392)، فسویتین زرده تخم‌مرغ و دکستران (Chen *et al*., 2014)، بتا-لاکتوگلوبولین و تک قندی‌های شش کربنه (Cheetangdee *et al*., 2014)، ایزوله پروتئین‌های سویا و بسیارقندی‌های محلول سویا (Yang *et al*., 2015)، آنزیم لیزوزیم و تراگاکانتین (Koshani *et al*., 2015) و بتا-لاکتوگلوبولین و صمغ فارسی (Golkar *et al*., 2015). با توجه به اینکه در پژوهش حاضر عملکرد صمغ‌های بومی ایرانی (کتیرا و صمغ فارسی) برای اتصال با پروتئین‌های شیر مورد مقایسه قرار گرفت در ادامه به معرفی اجمالی این صمغ‌ها پرداخته می‌شود.

صمغ کتیرا عصاره خشک شده به‌دست آمده از ساقه نوعی گون از جنس آستراگالوس (*Astragalus*) بوده که این گیاه به‌طور طبیعی در مناطقی از ایران، ترکیه و بعضی کشورهای دیگر رشد می‌نماید. این صمغ توسط سازمان غذا و داروی امریکا به‌عنوان یک ماده غذایی سالم طبقه‌بندی شده و به‌عنوان پایدارکننده، امولسیون‌کننده و قوام‌دهنده در صنایع غذایی، داروسازی و آرایشی- بهداشتی کاربرد دارد. این صمغ دارای بخش‌های محلول (تراگاکانتین) و نامحلول در آب (باسورین) می‌باشد که بخش محلول آن در دسته هیدروکلوئیدهای دارای بار منفی قرار دارد (Azarikia *et al*., 2010; Weiping *et al*., 2000).

صمغ فارسی صمغی است شفاف که از درخت بادام کوهی از خانواده گلسرخیان[1] به دست می‌آید و ایران عمده‌ترین تولیدکننده این صمغ فارسی است. قیمت صمغ فارسی در مقایسه با صمغ کتیرا به‌طور چشمگیری پایین‌تر است. این بسیارقندی تقریبا دارای 88/7 درصد قند کل و 10 درصد اورونیک اسید است که شاخه اصلی آن از نسبت تقریبی 1:2 گالاکتوز: آرابینوز ساخته شده است. همانند صمغ کتیرا، این صمغ از دو بخش محلول و نامحلول در آب تشکیل شده است که به‌ترتیب 30 و 70 درصد وزنی/ وزنی صمغ فارسی را به خود اختصاص می‌دهند. منطقه جغرافیایی رویش و رنگ صمغ بر برخی شاخص‌های فیزیکوشیمیایی صمغ تاثیر دارد (Abbasi *et al*., 2015; Fadavi *et al*., 2014).

هدف از پژوهش حاضر، یافتن شرایط بهینه تولید گلیکوپروتئین پروتئین‌های شیر–بخش محلول صمغ‌های بومی ایرانی (ایزوله پروتئین‌های سرمی–تراگاکانتین (WPI–SFGT)، کازئینات سدیم–تراگاکانتین (CN–SFGT)، ایزوله پروتئین‌های سرمی–بخش محلول صمغ فارسی (WPI–SFPG) و کازئینات سدیم–بخش محلول صمغ فارسی (CN–SFPG)) به روش میلارد خشک و بررسی کارایی کونژوگه‌های حاصل به منظور افزایش پایداری امولسیون‌های آب در روغن بود. به‌علاوه، این مطالعه امکان مقایسه عملکرد بخش محلول دو صمغ بومی را در اتصال به پروتئین‌های شیر میسر ساخت.

مواد و روش‌ها

ایزوله پروتئین‌های سرمی شیر با نام تجاری بیپرو[2] از شرکت دیویسکو امریکا تهیه شد که طبق گزارش تولید کننده به‌ترتیب شامل 97/6±0/3، <0/5، 2/0±0/2 و 0/4±0/2 درصد پروتئین، چربی، خاکستر و لاکتوز بود. کازئینات سدیم (m0130Vlot 100) نیز از شرکت سیگما تهیه شد. کتیرای نواری (گونه *آستراگالوس گوسیپینوس*[3]) از فروشگاه‌های عطاری سنتی تهران خریداری شد و پس از آسیاب کردن و عبور دادن الک آزمایشگاهی شماره 60، پودر

1 Rosaceae
2 BiPRO® Whey protein isolate
3 *A. gossypinus*

حاصل برای انجام آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت. صمغ فارسی (جمع آوری شده از جنگل‌های ارسباران در استان آذربایجان‌شرقی) نیز به همان صورت به پودر تبدیل شد. در ضمن، هیدروکسید سدیم، اسید کلریدریک و سدیم آزاید مورد استفاده از شرکت مواد شیمیایی مرک آلمان تهیه گردید. تری سدیم فسفات از شرکت فیشر (ساخت امریکا) و سایر مواد شیمیایی از شرکت سیگما تهیه شدند. از آب دیونیزه برای تهیه نمونه‌ها استفاده شد.

واکنش میلارد به روش خشک بین پروتئین‌های شیر و بخش محلول صمغ‌های بومی

برای تهیه کونژوگه‌ها به روش خشک، ابتدا صمغ‌های بومی در بافر فسفات سدیم 0/1 مولار (pH=7) حل و به مدت یک شب، جهت آب‌گیری کامل در یخچال نگهداری شدند. برای جداکردن فاز محلول و نامحلول آن‌ها از سانتریفوژ (صمغ فارسی به مدت 20 دقیقه و کتیرا به مدت 45 دقیقه در 14000 دور در دقیقه (20379*g*)) استفاده شد. محلول غلیظ پروتئین‌ها (3 درصد وزنی/ وزنی) نیز با حل کردن پودر آن‌ها در بافر تهیه گردید. برای به‌دست آوردن محلول کازئینات سدیم عاری از ذرات نامحلول، پراکنش حاصل به مدت 30 دقیقه در 14000 دور در دقیقه سانتریفوژ و از بخش محلول آن، که 80 درصد وزن کل پروتئین را به‌خود اختصاص داده بود، استفاده شد. پس از تهیه محلول‌ها، پروتئین‌ها و بسیارقندی‌ها مطابق نسبت‌هایی که در ادامه اشاره خواهد شد با یکدیگر مخلوط شدند (جدول 1) و پس از هم‌زدن (یک ساعت در 300 دور در دقیقه)، داخل فالکون‌های پلاستیکی منجمد (80- درجه سانتی‌گراد) و در پایان توسط خشک‌کن انجمادی خشک شدند. پس از خروج از خشک‌کن انجمادی، نمونه‌ها با استفاده از هاون آزمایشگاهی پودر شده و برای آزمایشات بعدی در فریزر (22- سانتی‌گراد) نگهداری شدند. به منظور ایجاد کونژوگه پروتئین– بسیارقندی، پودرهای حاصل درون پلیت‌های شیشه‌ای داخل دسیکاتور چیده شده و در آون 60 درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. لازم به ذکر است که جهت تامین رطوبت نسبی 79 درصد، دسیکاتور حاوی کلرید سدیم اشباع (0/37 گرم نمک به ازاء 1 میلی‌لیتر آب مقطر) بود. به‌منظور ایجاد تعادل هوای داخل دسیکاتور، دسیکاتورها از روز قبل در آون (60 درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند. از آن‌جایی که برای بهینه‌سازی میزان واکنش میلارد از روش سطح پاسخ استفاده شد مدت زمان اعمال حرارت روی نمونه‌ها طبق جدول 1 بود.

بررسی خصوصیات محصولات حاصل از واکنش میلارد

گروه‌های آمین آزاد ($-NH_2$) در نمونه‌ها با روش رنگ‌سنجی با استفاده از معرف نین‌هیدرین تعیین شدند (Muppalla *et al*., 2012; Doi *et al*., 1981)، با این آزمون که قادر به اندازه‌گیری گروه‌های آزاد α- و ε- آمین بود درصد جایگزینی گروه‌های آمین آزاد با محصولات واکنش میلارد (DS%) پس از قرائت میزان جذب نمونه (در طول موج 570 نانومتر با استفاده از دستگاه طیف‌نورسنج فرابنفش–مرئی) قبل از اعمال حرارت طی واکنش میلارد (A_0) و میزان جذب همان نمونه بعد از اعمال حرارت‌دهی است (A_1) با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید (Li *et al*., 2013; 2009):

$$DS\ (\%) = ((A_0-A_1)/A_0) \times 100 \qquad (1)$$

برای بررسی رنگ نمونه‌ها قبل و بعد از واکنش میلارد از دستگاه هانترلب (رستون، امریکا) استفاده شد که به‌منظور کالیبره نمودن دستگاه از صفحات سرامیکی سفید و سیاه استفاده شد (L^*=92/23، a^*= -1/29 b^*=1/19). مقادیر رنگ به‌صورت L^* (روشنایی)، a^* (قرمزی تا سبزی) و b^* (زردی تا آبی) بیان شدند. میزان تغییرات رنگ (ΔE^*) پس از حرارت‌دهی توسط فرمول زیر محاسبه گردید (Chung *et al*., 2015):

$$\Delta E^* = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2} \qquad (2)$$

تهیه امولسیون با استفاده از محصولات حاصل از میلارد خشک

برای تهیه امولسیون مقدار مشخصی از کونژوگه پروتئین–بسیارقندی حاصل از حرارت‌دهی خشک به 50 گرم آب دیونیزه اضافه شد (مقدار طوری محاسبه گردید که 0/4 درصد وزنی/ وزنی پروتئین در تمامی امولسیون‌ها وجود داشته باشد تا امولسیون‌ها با نمونه شاهد قابل مقایسه باشند). پس از هم‌زدن با استفاده از هم‌زن مغناطیسی به مدت 1/5 ساعت، برای اطمینان از آب‌گیری کامل در دمای 4 درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب نگهداری شد. سپس، 4 گرم روغن آفتابگردان و نیز آب دیونیزه برای رساندن وزن کل به 100 گرم اضافه شدند و در ادامه توسط هم‌زن مغناطیسی با سرعت 400 دور در دقیقه به مدت 5 دقیقه هم‌زده شد. فرایند پیش همگن‌سازی با استفاده از همگن‌ساز روتور-استاتور، التراتوراکس (WiseTis®HG-15D ، آلمان) در 4000 دور در دقیقه به‌مدت 3 دقیقه و 10000 دور در دقیقه به‌مدت 1 دقیقه صورت گرفت. سپس برای دستیابی به گویچه‌های ریز از همگن‌ساز فراصوت (Misonix sonicator، 4000، آمریکا) در شدت 100 درصد به مدت 4 دقیقه استفاده شد. در نهایت، pH امولسیون‌ها در pHهای 3، 5 و 7 تنظیم گردیده و سدیم آزاید (0/04 درصد وزنی/ وزنی) به‌منظور جلوگیری از رشد میکروبی به امولسیون‌ها اضافه شد. به‌منظور تعیین پایداری امولسیون‌ها، 12 میلی‌لیتر از امولسیون تهیه شده داخل لوله‌های شیشه‌ای منتقل و در یخچال (دمای 4 درجه سانتی‌گراد) به‌مدت 30 روز نگهداری شد. اندیس پایداری امولسیون[1] با استفاده از رابطه زیر

1 Emulsion stability index

محاسبه گردید که در این رابطه H_E ارتفاع کل امولسیون و H_S ارتفاع فاز سرمی است (Azarikia *et al*., 2016):

$$ESI = (H_E-H_S/H_E) \times 100 \quad (3)$$

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

برای تعیین شرایط بهینه ایجاد کونژوگه پروتئین– بسیارقندی از طرح آماری سطح پاسخ[1] و طراحی مرکب مرکزی[2] استفاده شد. شکل اصلی طراحی مرکب مرکزی، طراحی مرکب مرکزی محیطی[3] است که این طراحی برای بهینه‌سازی ایجاد کونژوگه به روش میلارد با مطالعه اثر دو متغیر مستقل مورد استفاده قرار گرفت. اثر متغیرهای مستقل شامل: X_1 (نسبت پروتئین:بسیارقندی) و X_2 (زمان حرارت‌دهی) در 5 سطح (جدول 1) مورد بررسی قرار گرفت.

مطابق جدول 2 تعداد نمونه‌های آزمایش برای تشکیل کونژوگه هر یک از ترکیبات پروتئین– بسیارقندی برابر 11 مورد بود که در این میان 3 آزمون تکرار در نقطه مرکزی بودند و این نقاط برای تخمین خطای آزمایش استفاده شدند. میانگین پاسخ‌های به‌دست آمده (میزان جایگزینی آمین آزاد و میزان تغییر رنگ) از 2 مرتبه تکرار هر آزمایش به‌عنوان متغیر وابسته یا پاسخ (Y) بوده و نتایج آزمون بر اساس معادله درجه دوم زیر تحلیل گردید:

$$Y= \beta_0 + \beta_1x_1+ \beta_2x_2 + \beta_3x_1^2 + \beta_4x_2^2 + \beta_5x_1x_2 \quad (4)$$

که در این فرمول Y= پاسخ پیش‌بینی شده، β_0= ضریب ثابت، β_1 و β_2= اثرات خطی، β_3 و β_4= اثر مربعات و β_5= اثر متقابل می‌باشند. در ضمن، به‌منظور تجزیه و تحلیل اطلاعات، به‌دست آوردن ضرایب مدل و رسم نمودارهای مربوط به روش سطح پاسخ از نرم‌افزار مطلب (نسخه 8/1) استفاده شد. تمامی آزمون‌های این پژوهش حداقل دوبار تکرار شدند

نتایج و بحث

اعمال حرارت‌دهی خشک برای ایجاد کونژوگه پروتئین– بسیارقندی

همان‌گونه که در بخش مواد و روش‌ها اشاره شد از دو مدت زمان مختلف برای ایجاد واکنش میلارد بین صمغ‌های بومی با ایزوله پروتئین‌های سرمی (پروتئین‌های کروی) و کازئینات سدیم (پروتئین با ساختاری نسبتا باز) استفاده شد که دلیل این مطلب، تفاوت در شکل فضایی این پروتئین‌ها بود، چرا که طبق مطالعاتی که پیش‌تر صورت گرفته است شکل فضایی مولکول‌های پروتئین و نیز وزن مولکولی بسیارقندی نقش مهمی را در ایجاد کونژوگه به روش میلارد ایفا می‌کند (Liu *et al*., 2012; Wooster *et al*., 2007).

همانگونه که در شکل 1 نشان داده شده است اعمال حرارت‌دهی به روش خشک سبب تغییر رنگ نمونه‌ها به رنگ‌های متمایل به زرد و قهوه‌ای شده است. تغییر رنگ نمونه‌ها از سفید به زرد نشان‌دهنده تشکیل محصولات آمادوری و واکنش‌های بعدی مربوط به قهوه‌ای شدن غیر آنزیمی است (Koshani *et al*., 2015; O’Regan *et al*., 2009).

بهینه‌سازی میزان واکنش میلارد به روش خشک

تعیین گروه‌های آمین آزاد روش متداولی برای تخمین پیشرفت واکنش میلارد است. با این آزمون می‌توان میزان اتصال پروتئین‌ها به بسیارقندی‌ها (تشکیل کونژوگه) از طریق کاهش میزان گروه‌های آمین آزاد پی برد (Wang *et al*., 2012; Guan *et al*., 2010). جدول 3 طراحی آزمون‌ها براساس مدل طرح مرکب مرکزی با دو متغیر (نسبت پروتئین: بسیارقندی و زمان حرارت‌دهی) به همراه نتایج (درجه جایگزینی گروه‌های آمین آزاد و میزان تغییر رنگ) را برای کونژوگه پروتئین‌های شیر–بخش محلول صمغ‌های بومی نشان می‌دهد. لازم به ذکر است که در مورد درجه جایگزینی گروه‌های آمین آزاد هدف رسیدن به محدوده‌ای با بیشینه این پاسخ بود؛ در حالی‌که، در مورد میزان تغییر رنگ، هدف رسیدن به محدوده کمینه این پاسخ بود تا رنگ محصول تا حد امکان تحت تاثیر قرار نگیرد. مقایسه درجه جایگزینی گروه‌های آمین آزاد در نمونه‌های دارای تراگاکانتین و بخش محلول صمغ فارسی نشان داد که در حضور پروتئین‌های یکسان، میزان جایگزینی در نمونه‌های دارای بخش محلول صمغ فارسی بیشتر از تراگاکانتین بوده است (جدول3 و شکل 2). توانایی بیشتر بخش محلول صمغ فارسی برای برقراری اتصال کووالانسی با پروتئین‌ها ممکن است ناشی از سه تفاوت در ساختار این دو صمغ بومی باشد.

اول اینکه، احتمالا شاخه‌های جانبی بیشتری در ساختار تراگاکانتین در مقایسه با بخش محلول صمغ فارسی وجود داشته که پس از اتصال پروتئین به بسیارقندی، تراکم شاخه‌های جانبی از طریق دافعه فضایی از ایجاد واکنش‌های بعدی جلوگیری کرده است. در مورد ساختار صمغ کتیرا و تراگاکانتین گفته شده است که دارای شاخه‌های جانبی بسیاری هستند و در مدل ارایه شده برای ساختار کتیرا، تک‌قندی‌های سازنده شاخه اصلی تقریبا به طور یک در میان دارای شاخه جانبی هستند (Tischer *et al*., 2002; Weiping *et al*., 2000). در مورد ساختار صمغ فارسی اشاره شده است که شاخه اصلی از گالاکتوز و آرابینوز با نسبت تقریبی 1:2 ساخته شده و حضور بقایای قندی گالاکتوپیرانوزیل (6–1) و آرابینوفورانوزیل (3–1) در شاخه‌های جانبی اثبات شده است (Abbasi *et al*., 2015).

1 Response surface methodology
2 Central composite design
3 Central composite circumscribed

طبق مطالعات پیشین نیز نشان می‌دهند که حضور شاخه‌های جانبی در ساختار بسیارقندی‌ها به کندتر شدن سرعت واکنش میلارد منجر می‌شود (Xu *et al.*, 2010; Dunlap *et al.*, 2005).

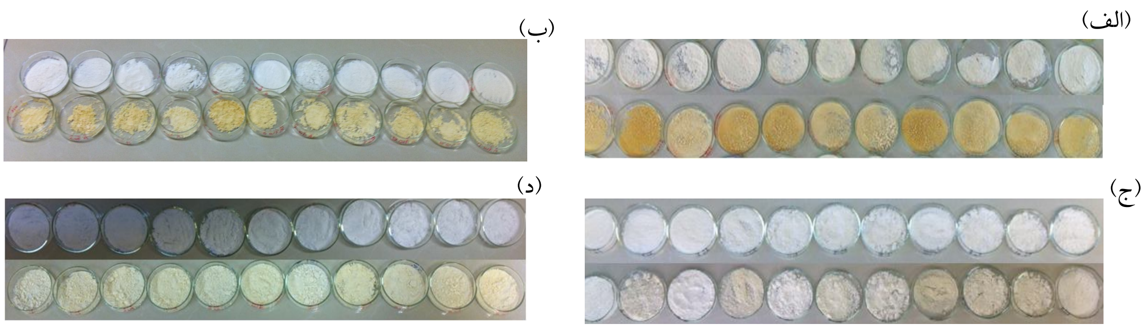
جدول 1- نمایش متغیرهای مستقل فرایند و مقادیر آن‌ها.

متغیرهای مستقل	علائم		سطوح				
	Uncoded	**Coded**	**-1/41**	**-1**	**0**	**+1**	**+1/41**
نسبت بسپارهای زیستی (وزنی/وزنی)	X_1	x_1	1:1/59	1:2	1:3	1:4	1:4/41
زمان (روز)[1]	X_2	x_2	2/36	4	8	12	13/64
زمان (ساعت)[2]	X_2	x_2	2/18	3	5	7	7/82

زمان برحسب روز متغیرمستقل برای نمونه‌های تهیه شده از پروتئین‌های سرمی شیر بود.
زمان برحسب ساعت متغیرمستقل برای نمونه‌های تهیه شده از کازئینات سدیم بود.

جدول 2- نمایش طراحی آزمون براساس مدل طرح مرکب مرکزی با دو متغیر

شماره آزمون	مقادیر متغیرها	
	x_1	x_2
1	-1	-1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	+1	+1
5	-1/41	0
6	+1/41	0
7	0	-1/41
8	0	+1/41
9	0	0
10	0	0
11	0	0



شکل 1- شکل ظاهری نمونه‌ها قبل (ردیف بالا) و بعد (ردیف پایین) از تیمار حرارتی به روش خشک. 11 تیمار هر سامانه از چپ به راست نمایش داده شده‌اند. (الف) کازئینات سدیم–بخش محلول صمغ فارسی، (ب) ایزوله پروتئین‌های سرمی–بخش محلول صمغ فارسی، (ج) کازئینات سدیم–تراگاکانتین و (د) ایزوله پروتئین‌های سرمی–تراگاکانتین.

دومین علت تفاوت عملکرد بخش محلول صمغ فارسی ممکن است ناشی از تفاوت در وزن مولکولی بخش محلول صمغ فارسی و تراگاکانتین باشد. گفته می‌شود که بسیارقندی‌ها با وزن مولکولی بالاتر با سرعت کمتری در واکنش میلارد شرکت می‌کنند (Liu *et al.*, 2012; Kato, 2002). محققان اشاره کرده‌اند که با افزایش وزن مولکولی قندها، درجه جایگزینی کاهش می‌یابد (Li *et al.*, 2009). هم‌چنین، گزارش شده است که در ایجاد کونژوگه پروتئین‌های شیر–دکستران درصورت استفاده از دکستران با وزن مولکولی پایین‌تر

(10000 دالتون) مقدار کونژوگـه بیشـتری در مقایسـه بـا اسـتفاده از دکستران با وزن مولکولی بالاتر (20000 دالتون) تولیـد شـده اسـت (Jimenez-Castano *et al.*, 2007). طبق بررسی‌های پیشـین، هـر چه وزن مولکولی بسیارقندی بیشتر باشد زمان لازم برای تشکیل باز شیف نیز بیشتر خواهد بـود (Zhu *et al.*, 2010)؛ از ایـن‌رو، سـرعت تشکیل کونژوگه و قهوه‌ای شدن بـا افـزایش وزن مولکـولی کـاهش می‌یابد (Xu *et al.*, 2010). در مورد وزن مولکولی تراگاکانتین اشاره شده اسـت کـه مقـدار آن $5/02\times10^{5}$ (Hoagland *et al.*, 1993) و $1/6\times10^{6}$ دالتون می‌باشد (Mohammadifar *et al.*, 2006). اگرچه وزن مولکولی بخش محلول صمغ فارسی در منابع یافت نشـد تـا بـا تراگاکانتین مورد مقایسه قرار گیرد، ولی در مورد صمغ فارسی (درجه 1) اشاره شده اسـت کـه دارای وزن مولکـولی $4/74\times10^{6}$ دالتـون اسـت (Fadavi *et al.*, 2014). این در حالی است که وزن مولکولی صـمغ کتیرا 840 کیلودالتون ذکر شده است (Balaghi *et al.*, 2010).

سومین علت می‌تواند مربوط بـه سـاختار فضـایی ایـن بسـپارها (سخت بودن یا انعطاف‌پذیر بودن) آن‌ها مربوط باشد. انعطاف ناپـذیر بـودن سـاختار تراگاکـانتین قـبلا بـه اثبـات رسـیده اسـت (Mohammadifar *et al.*, 2006).

جدول 3- نمایش طراحی آزمون‌ها براساس مدل طرح مرکب مرکزی با دو متغیر (نسبت پروتئین به بسیارقندی و زمان) به‌همراه نتایج (درجه جایگزینی گروه‌های آمین آزاد (Y_1) و میزان تغییر رنگ (Y_2)) برای تشکیل کونژوگه ایزوله پروتئین‌های شیر–بخش محلول صمغ‌های بومی.

آزمون	کد متغیرها		نتایج آزمون							
			WPI–SFPG		WPI–SFGT		CN–SFPG		CN–SFGT	
	x_1	x_2	Y_1	Y_2	Y_1	Y_2	Y_1	Y_2	Y_1	Y_2
1	-1	-1	16/56±1/62	18/50	9/26±0/32	6/73	18/65±0/88	12/99	7/14±0/88	6/68
2	-1	+1	30/35±1/18	19/75	14/75±0/61	6/88	33/42±0/65	24/07	20/78±0/97	17/25
3	+1	-1	14/19±0/29	17/85	10/94±0/83	9/45	15/62±1/91	10/42	7/26±0/62	6/41
4	+1	+1	26/24±1/19	16/73	17/15±0/92	10/75	25/16±2/43	15/61	18/45±0/87	14/13
5	-1/41	0	32/37±1/70	21/91	13/03±0/19	8/82	29/31±0/89	19/90	15/87±0/57	6/86
6	+1/41	0	24/67±0/57	18/05	12/61±0/58	11/12	21/32±1/50	21/08	14/26±0/59	7/70
7	0	-1/41	10/49±2/04	15/18	10/34±0/37	7/46	16/80±1/78	10/29	10/16±0/73	6/10
8	0	+1/41	23/52±0/63	13/65	19/82±0/68	14/67	33/07±0/54	22/54	21/95±1/79	15/58
9	0	0	19/23±0/56	18/08	15/33±0/74	9/86	28/01±0/69	15/13	13/76±1/34	7/12
10	0	0	21/57±0/42	16/96	14/13±0/12	8/45	28/52±0/51	17/37	17/31±0/59	8/03
11	0	0	20/06±0/39	14/69	14/72±0/30	11/44	26/06±1/48	18/39	16/23±0/44	7/41

معادله‌ها (مدل‌های) چند جملـه‌ای درجـه دوم زیـر کـه از نتـایج تجزیه واریانس برای آزمایش بهینه‌سازی درجه جایگزینی گروه‌هـای آمین آزاد به‌دست آمده‌اند ارتباط متغیرهای مستقل را با پاسخ (درجـه جایگزینی) برای (1) ایزوله پروتئین‌های سرمی–بخش محلول صمغ فارسی، (2)، کازئینات سدیم–بخش محلول صمغ فارسی (3) ایزولـه پروتئین‌های سرمی–تراگاکانتین و (4) کازئینات سدیم–تراگاکـانتین نشان می‌دهند.

$$Y=40/664-24/708x_1+3/6015x_2+3/9009x_1^2-0/11811x_2^2-0/10875x_1x_2 \quad (5)$$

$$Y=-9/8271+7/9309x_1+8/9526x_2-1/3439x_1^2-0/4467x_2^2-0/5288x_1x_2 \quad (6)$$

$$Y=-2/7402+7/2313x_1+0/7062x_2-1/1923x_1^2-0/0035x_2^2+0/045x_1x_2 \quad (7)$$

$$Y=-10/701+6/354x_1+4/5159x_2-0/8974x_1^2-0/09986x_2^2-0/30625x_1x_2 \quad (8)$$

نتایج حاصل از تجزیه واریانس برای آزمایش بهینه‌سازی درجـه جایگزینی گروه‌های آمین آزاد نشان داد که مدل‌های ارایه شده برای هر چهار حالت پروتئین‌های شیر–بخش محلـول صـمغ‌هـای بـومی معنی‌دار بوده (p<0/05)، دارای ضـریب تعیـین بـالایی ($R^2 \geq 0/9$) بوده و دوری از برازش (Lack of fit) نیز در هر چهار ترکیب معنی‌دار نبود (داده‌ها نشان داده نشده‌اند). لذا، مدل‌های به‌دست آمده می‌توانند برای پیش‌گـویی درجـه جـایگزینی در محـدوده متغیرهـای مسـتقل آزمایش شده مورد استفاده قرار گیرند. مقادیر معنی‌دار بودن ضـرایب همبستگی نیز نشان داد که برای ایزوله پروتئین‌های سرمی– بخـش محلول صمغ فارسی، تابع درجه اول نسـبت پـروتئین: بسـیارقندی و زمان حرارت‌دهی تاثیر معنی‌دار بر درجه جایگزینی گروه‌هـای آمـین آزاد داشته‌اند (p<0/05) (داده‌ها نشان داده نشده‌اند). به‌عبارت دیگـر، با توجه به ضرایب به‌دست آمده یک رابطـه خطـی و معکـوس بـین نسبت پروتئین:بسیارقندی و درجه جایگزینی و نیز یک رابطه خطی و مستقیم میان مدت زمان حرارت‌دهی و درجه جایگزینی برقرار اسـت

که هرچه میزان بسیارقندی کاهش و زمان حرارت‌دهی افزایش یابد میزان درجه جایگزینی افزایش می‌یابد. بررسی اثر مربعات نیز حاکی از آن است که متغیرهای مستقل به صورت تابع درجه دوم نیز بر میزان درجه جایگزینی اثر دارند. نتایج هم‌چنین نشان می‌دهند که اثر متقابل این دو متغیر مستقل بر میزان درجه جایگزینی معنی‌دار نمی‌باشد (p>0/05).

برخلاف سایر نمونه‌ها، در مورد کازئینات سدیم–تراگاکانتین، نتایج آزمایشات حاکی از معنی‌دار نبودن ضرایب بر میزان درجه جایگزینی بود (p>0/05). شاید ساختار سخت و دارای شاخه‌های جانبی زیاد تراگاکانتین از طریق ایجاد ممانعت فضایی از اتصال دو مولکول نین‌هیدرین توسط گروه آمین آزاد جلوگیری کرده است. این اتصال اساس اندازه‌گیری میزان آمین آزاد در روش به‌کار رفته برای سنجش درجه جایگزینی است. بنابراین، شاید بهتر باشد در نمونه‌های دارای تراگاکانتین برای اندازه‌گیری میزان آمین آزاد از سایر معرف‌ها مانند ارتو-فتال دی‌آلدئید (OPA) و تری نیترو بنزن سولفونیک اسید (TNBS) استفاده شود. شکل 2 تاثیر تغییر مقدار بسیارقندی و زمان حرارت‌دهی بر درجه جایگزینی را به‌صورت منحنی‌های سطح پاسخ و کانتور برای پروتئین‌های شیر–بخش محلول صمغ‌های بومی نشان می‌دهد. در مورد ایزوله پروتئین‌های سرمی–بخش محلول صمغ فارسی مشاهده می‌شود که در یک نسبت ثابت پروتئین:بسیارقندی افزایش دما سبب افزایش درجه جایگزینی می‌شود. وجود رابطه مستقیم بین مدت زمان حرارت‌دهی و درجه جایگزینی می‌تواند به باز شدن نسبی ساختار پروتئین‌های سرمی و در معرض قرار گرفتن گروه‌های فعال برای واکنش با بسیارقندی مربوط باشد. کاهش گروه‌های آمین آزاد با افزایش زمان حرارت‌دهی در سایر تحقیقات نیز مشاهده شده است (Koshani *et al.*, 2015; Al-Hakkak *et al.*, 2010).

همچنین، مشاهده می‌گردد که در یک زمان ثابت، افزایش مقدار بسیارقندی در ابتدا تاثیر کاهنده روی درجه جایگزینی دارد، ولی افزایش بیشتر مقدار بسیارقندی سبب افزایش درجه جایگزینی می‌شود. علت برقرار بودن رابطه معکوس (تا یک حد مشخصی از بسیارقندی) بین بسیارقندی و درجه جایگزینی را می‌توان این‌گونه توجیه کرد که احتمالا تراکم بسیارقندی و شاخه‌های جانبی آن از طریق ممانعت فضایی از نزدیک شدن و اتصال گروه‌های فعال پروتئین و بسیارقندی جلوگیری می‌کنند. بنابراین، هرچه میزان بسیارقندی کمتر باشد امکان ایجاد واکنش میلارد بین دو بسپار زیستی بیشتر می‌شود. ولی، همان‌گونه که اشاره شد پس از یک روند کاهشی، یک روند افزایشی در درجه جایگزینی با افزایش مقدار بسیارقندی دیده می‌شود که احتمالا بعد از یک حد مشخص افزایش تراکم بسیارقندی احتمال برقراری اتصال را بالا برده است.

در مورد کازئینات سدیم–بخش محلول صمغ فارسی در یک مقدار ثابتی از بسیارقندی افزایش زمان سبب افزایش درجه جایگزینی شده است. در حالی‌که، در یک زمان ثابت (به‌خصوص در مدت زمان‌های پایین) افزایش مقدار بسیارقندی تاثیر چندانی بر درجه جایگزینی نداشت، هر چند در زمان‌های طولانی‌تر افزایش مقدار بسیارقندی روند کاهشی بر درجه جایگزینی نشان داد.

علت این روند متفاوت (در دماهای پایین) در مقایسه با ایزوله پروتئین‌های سرمی–بخش محلول صمغ فارسی شاید ناشی از تفاوت در ساختار پروتئین‌ها باشد؛ چون برخلاف ایزوله پروتئین‌های سرمی، کازئینات سدیم تقریبا ساختاری تانخورده‌ای داشته و اتصال پروتئین و بسیارقندی با سهولت بیشتری انجام می‌گیرد. لذا، احتمالا بسیارقندی‌های متصل شده از طریق دافعه فضایی از نزدیک شدن و اتصال سایر بسیارقندی‌ها به گروه‌های آمین آزاد پروتئین جلوگیری می‌کنند (Wong *et al.*, 2011) و فرقی نمی‌کند چه مقدار بسیارقندی در ابتدا اضافه شده باشد. در مورد ایزوله پروتئین‌های سرمی–تراگاکانتین در یک نسبت پروتئین: بسیارقندی ثابت، افزایش زمان حرارت‌دهی سبب افزایش درجه جایگزینی شد و در یک زمان حرارت‌دهی ثابت، در زمان‌های کوتاه‌تر افزایش غلظت بسیارقندی تاثیر چندانی بر پاسخ نداشت. در حالی‌که، در زمان‌های طولانی‌تر با افزایش غلظت بسیارقندی در ابتدا یک روند نزولی سپس صعودی در میزان جایگزینی مشاهده شد. در مورد کازئینات سدیم–تراگاکانتین نیز در یک نسبت پروتئین: بسیارقندی ثابت، افزایش زمان حرارت‌دهی افزایش درجه جایگزینی را به دنبال داشت. با این وجود، در یک زمان حرارت‌دهی ثابت، افزایش غلظت بسیارقندی تفاوت چندانی در میزان پاسخ ایجاد نکرد.

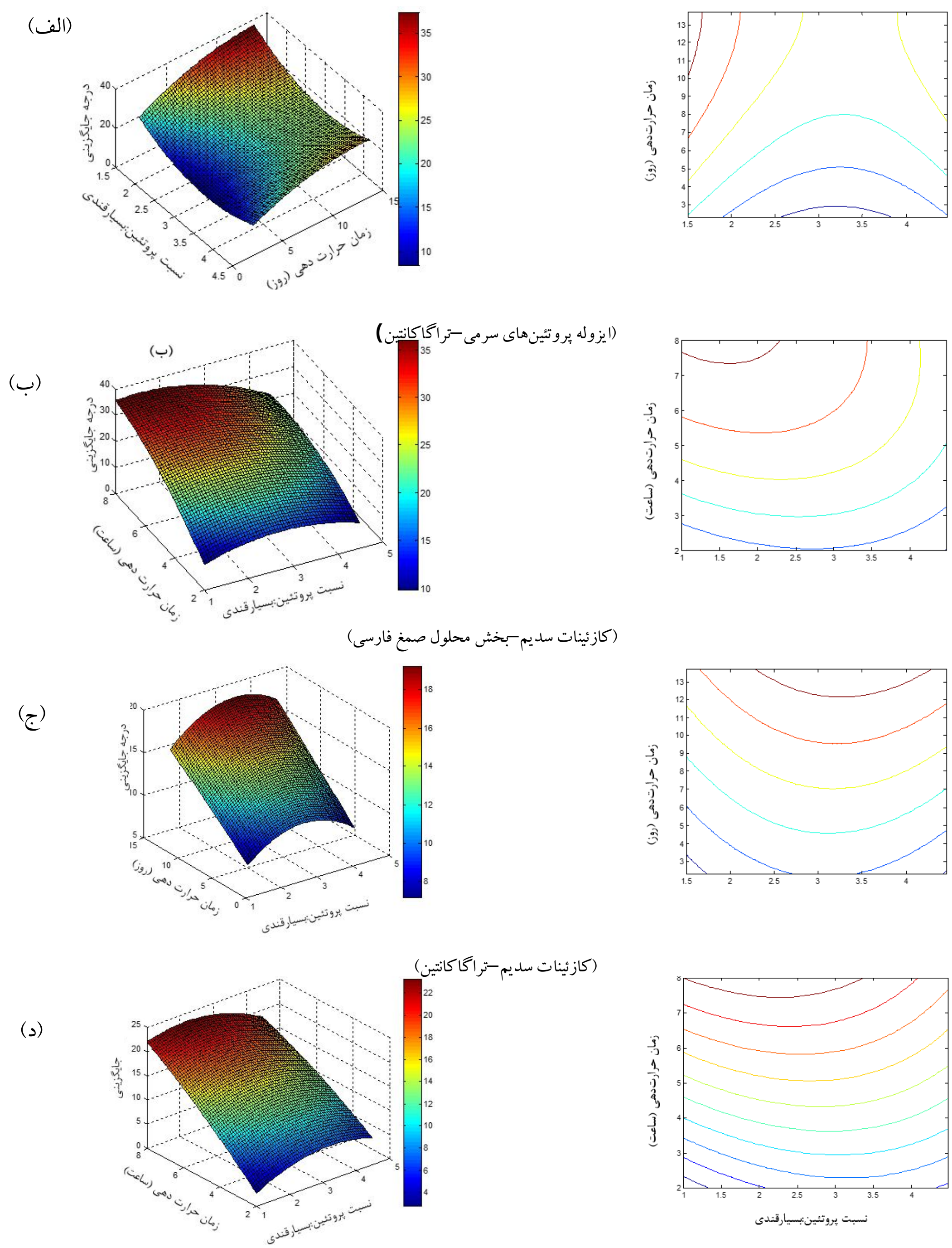
بررسی میزان رنگ کونژوگه‌های ایجاد شده به روش خشک

نتایج حاصل از مطالعه میزان رنگ کونژوگه پروتئین‌های شیر–بخش محلول صمغ‌های بومی قبل و بعد از اعمال حرارت نشان داد که اعمال حرارت به روش خشک به کاهش L^* و افزایش a^* و b^* منجر شد (داده‌ها نشان داده نشده‌اند).

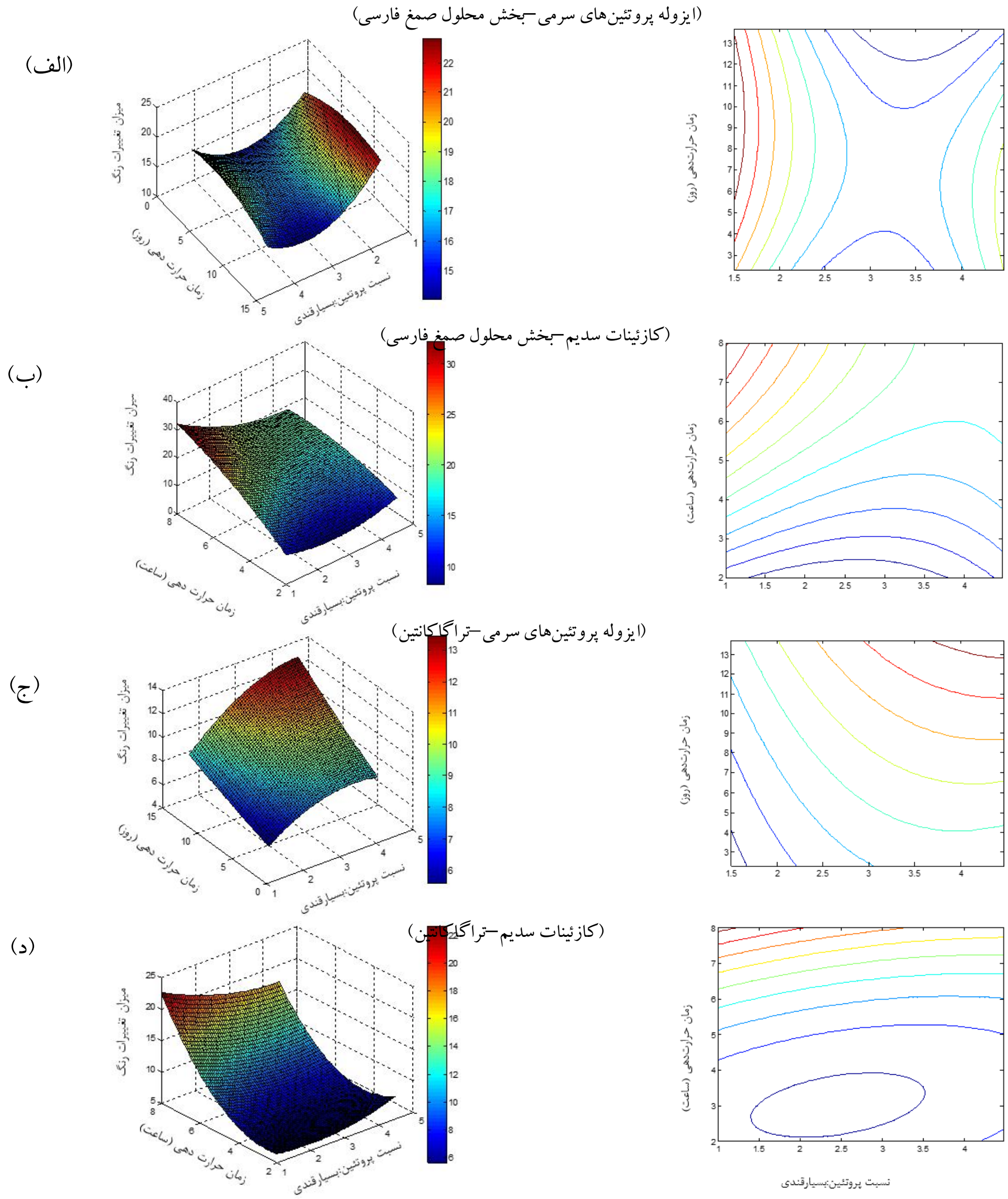
پیش‌تر نیز گزارش شده است که ایجاد کونژوگه کازئینات سدیم–مالتودکسترین سبب کاهش L^* و افزایش a^* و b^* گردید (Li *et al.*, 2015; O'Regan *et al.*, 2009). محققین تاکید کرده‌اند که گرچه ایجاد کونژوگه پروتئین–بسیارقندی در بهبود عملکرد پروتئین موثر است، ولی رنگ ایجاد شده نبایستی رنگ محصول را تحت تاثیر قرار دهد (Yadav *et al.*, 2010). طبق نتایج به‌دست آمده از بررسی تغییر رنگ برای ایزوله پروتئین‌های سرمی– بخش محلول صمغ فارسی معادله زیر می‌تواند برای پیشگویی میزان تغییرات رنگ با استفاده از متغیرهای مستقل در محدوده مورد آزمایش با ضریب اطمینان 95 درصد (p<0/0495) مورد استفاده قرار گیرد (نتایج تجزیه

واریانس و مقادیر معنی‌دار بودن متغیرها برای آزمایش بهینه‌سازی میزان تغییر رنگ آورده نشده‌اند)

(ایزوله پروتئین‌های سرمی–بخش محلول صمغ فارسی)



شکل 2- منحنی‌های سطح پاسخ و کانتور برای بررسی هم‌زمان اثر نسبت پروتئین: بسیارقندی و زمان حرارت‌دهی بر میزان درجه جایگزینی گروه‌های آمین آزاد. مقدار بسیارقندی در این شکل به ازاء 1 قسمت پروتئین می‌باشد.



شکل 3. منحنی‌های سطح پاسخ و کانتور برای بررسی هم‌زمان اثر نسبت پروتئین: بسیارقندی و زمان حرارت‌دهی بر میزان تغییر رنگ. مقدار بسیارقندی در این شکل به ازاء 1 قسمت پروتئین می‌باشد.

$$Y=31/296-11/741x_1+1/2133x_2+1/9642x_1^2-0/051993x_2^2-0/14824x_1x_2 \quad (9)$$

اثرات خطی و درجه دوم نسبت پروتئین:بسیارقندی در مورد این نمونه معنی‌دار بود؛ در حالی‌که، اثرات خطی و درجه دوم مدت زمان حرارت‌دهی و اثر متقابل نسبت پروتئین: بسیارقندی و مدت زمان حرارت‌دهی تاثیر معنی‌داری بر پاسخ ندارند. در مورد نمونه‌های کازئینات سدیم–بخش محلول صمغ فارسی و ایزوله پروتئین‌های سرمی–تراگاکانتین معادلات به‌دست آمده از لحاظ آماری معنی‌دار نبودند (p>0/05). در رابطه با کازئینات سدیم–تراگاکانتین اگرچه p<0/01025 نشان‌دهنده معنی‌دار بودن مدل بود، ولی از آن‌جایی که

دوری از برازش نیز از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد استفاده از این مدل برای پیشگویی میزان پاسخ قابل اعتماد نمی‌باشد.

بنابراین، به‌نظر می‌رسد جز در مورد ایزوله پروتئین‌های سرمی–بخش محلول صمغ فارسی، در مورد سایر نمونه‌ها نمی‌توان با داشتن معادله‌ای میزان تغییر رنگ را تخمین زد. شکل 3 منحنی‌های سطح پاسخ و کانتور را برای بررسی هم‌زمان اثر نسبت پروتئین: بسیارقندی و زمان حرارت‌دهی بر میزان تغییر رنگ نشان می‌دهند. طبق گزارش پژوهش‌گران، کاهش در گروه‌های آمین آزاد با افزایش شدت قهوه‌ای شدن همراه است (Li *et al*., 2013; Xu *et al*., 2010). از طرف دیگر، بیان شده است که اتصال پروتئین و بسیارقندی از طریق واکنش میلارد بدون مشاهده رنگ قهوه‌ای نیز امکان دارد، زیرا این واکنش در مرحله ابتدایی واکنش میلارد اتفاق می‌افتد و شدت رنگ قهوه‌ای لزوما ارتباطی با مقدار ایجاد کونژوگه ندارد (Lievonen *et al*., 2002).

تاثیر کونژوگه‌های ایجاد شده به روش خشک در پایداری امولسیون‌ها

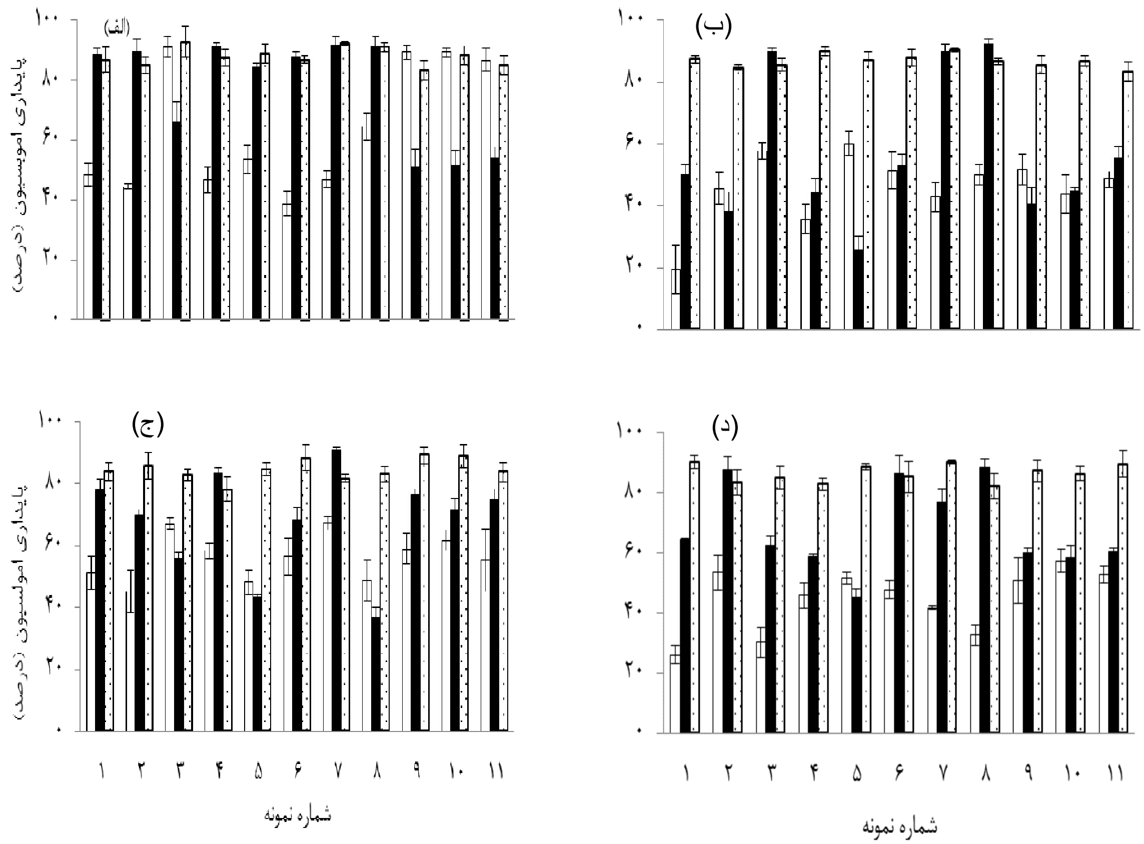
شکل 4 میزان پایداری امولسیون‌های تهیه شده با استفاده از کونژوگه پروتئین‌های شیر–بخش محلول صمغ‌های بومی را در pHهای مختلف (3، 5 و 7) نشان می‌دهد. همان‌گونه که مشاهده می‌شود امولسیون‌های تهیه شده با استفاده از کونژوگه پروتئین‌ها–بسیارقندی‌ها در هیچ یک از pHها دارای پایداری کامل نبودند. نکته جالب این‌که در امولسیون‌های بر پایه ایزوله پروتئین‌های سرمی (نمونه‌های شاهد) در شرایط یکسان با این امولسیون‌ها (دارای 4 درصد وزنی/ وزنی روغن و 0/4 درصد پروتئین) در pHهای 3 و 7 پایداری کامل دیده شد (Azarikia *et al*., 2016)؛ در حالی‌که، حضور کونژوگه پروتئین– بسیارقندی به ناپایداری امولسیون‌ها در این pHها منجر شد. احتمالا بسیارقندی متصل شده به پروتئین مانند سدی از اتصال بخش‌های آب‌گریز پروتئین به گویچه‌های چربی ممانعت کرده است. ساختار انعطاف‌ناپذیر تراگاکانتین نیز احتمال حبس شدن پروتئین‌ها در ساختار این بسیارقندی را بیشتر می‌کند؛ لذا، به‌علت ممانعت فضایی ایجاد شده پروتئین قادر نبود تا به خوبی نقش خود را به‌عنوان امولسیون‌کننده ایفا کند. احتمالا همین حالت در مورد بخش محلول صمغ فارسی به علت داشتن شاخه‌های جانبی نیز صادق باشد. سایر محققان نیز به این نکته اشاره داشته‌اند که اتصال بسیارقندی به پروتئین می‌تواند به کاهش عملکرد پروتئین در پایدارسازی امولسیون (به‌خصوص در pH پایین‌تر از نقطه ایزوالکتریک) منجر شود. این پژوهش‌گران گزارش کردند که احتمال وقوع واکنش الکترواستاتیک بین بسپارهای زیستی دارای بار مخالف در pHهای اسیدی باعث می‌شود که در سامانه دافعه الکترواستاتیک ضعیف‌تری در مقایسه با حالتی است که پروتئین به تنهایی در لایه بین سطحی روغن و آب قرار دارد وجود داشته باشد (Ettelaie *et al*., 2014). در پژوهش حاضر نیز مقایسه میزان ناپایداری در pHهای مختلف نشان داد که تقریبا در تمامی نمونه‌ها بیشترین میزان ناپایداری امولسیون‌ها در pH 3 مشاهده شد. از آن‌جایی‌که در این pH پروتئین دارای بار مثبت بیشتری در مقایسه با سایر pHها است، احتمالا واکنش الکترواستاتیک قوی بین گروه‌های دارای بار مثبت پروتئین و گروه‌های کربوکسیل بسیارقندی‌ها ایجاد شده که به حبس شدن بیشتر پروتئین داخل مولکول‌های بسیارقندی منجر شده است و از اتصال پروتئین با روغن ممانعت به‌عمل آمده است. در pH 7 نیز احتمالا تهی‌سازی تجمعی (Depletion flocculation) به‌علت حضور بسیارقندی‌های موجود در فاز پیوسته، در توده‌ای شدن گویچه‌های چربی موثر بوده است.

از دلایل احتمالی دیگر که ممکن است در عدم پایداری کامل امولسیون‌ها نقش داشته است می‌توان به این عوامل اشاره کرد: (الف) اعمال فراصوت باعث شکستن ساختار بسیارقندی‌ها، کاهش کارایی آن‌ها در ایجاد دافعه فضایی و نیز کاهش گرانروی شده است. (ب) اعمال فراصوت بخشی از پیوند کووالانسی ایجاد شده طی واکنش میلارد بین پروتئین و بسیارقندی را شکسته است که البته این موضوعات نیاز به انجام بررسی‌های بیشتری دارد.

پژوهش‌گران دیگری نیز بر مفید نبودن استفاده از کونژوگه پروتئین–بسیارقندی بر پایداری امولسیون‌ها تاکید داشته‌اند. در این راستا بیان شده است که وزن مولکولی بسیارقندی متصل شده نیز در ایجاد یا عدم ایجاد پایداری امولسیون نقش دارد؛ طوری‌که، ایجاد کونژوگه آلبومین سرم گاوی با دکستران با وزن مولکولی بالا (50000 دالتون) ویژگی امولسیون‌کنندگی را بهبود نداد، ولی ایجاد کونژوگه با دکستران با وزن مولکولی پایین (4000 دالتون) اثر مثبت بر پایداری داشت. این محققین گزارش کرده‌اند که کونژوگه دکستران با بتاکازئین که یک پروتئین مارپیچ تصادفی انعطاف‌پذیر است بر رفتار امولسیون‌کنندگی پروتئین اثر منفی داشت. دلیل آن مربوط به اندازه بزرگ دکستران متصل شده به پروتئین بوده است که به‌طور فضایی مانع اتصال گروه‌های آب‌گریز پروتئین به سطح مشترک روغن–آب شده و در نتیجه فعالیت سطحی پروتئین و سرعت جذب سطحی شدن آن را کاهش داده است (Dickinson *et al*., 1992). گروهی از پژوهش‌گران نیز معتقدند که ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی در مراحل اولیه واکنش میلارد افزایش یافته ولی افزایش زمان و پیشرفت واکنش می‌تواند به کاهش این ویژگی منجر شود (Li *et al*., 2009) که علت آن کاهش خاصیت آب‌گریزی پروتئین در اثر پیشرفت واکنش است (Li *et al*., 2013).

البته باید اشاره کرد که برخلاف نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، محققان افزایش پایداری امولسیون‌ها با استفاده از کونژوگه پروتئین‌ها و بسیارقندی‌ها را نیز گزارش کرده‌اند (Koshani *et al*.,

2015; Cheetangdee *et al*., 2014; Chen *et al*., 2014; Wong *et al*., 2011; Li *et al*., 2009; Wooster *et al*., 2007; Neirynck *et al*., 2004; 2006). احتمالا تفاوت در روش همگن‌سازی طی تهیه امولسیون در تحقیق حاضر و پژوهش‌های پیشین یکی از دلایل عمده این اختلاف بوده است. لازم به ذکر است که بررسی پایداری در pHهای مختلف نیز حاکی از پایدار نبودن در تمامی pHها بوده است؛ طوری‌که، استفاده از کونژوگه ایزوله پروتئین‌های سرمی–پکتین در تولید امولسیون در pH 5/5 در پایداری امولسیون موثر بود، ولی در pH 4 تاثیر مثبتی بر پایداری نداشته است (Neirynck *et al*., 2004).



شکل 4- نمایش میزان پایداری امولسیون‌های تهیه شده با کونژوگه پروتئین–بسیارقندی‌های تشکیل شده به روش خشک. میزان روغن آفتابگردان 4 درصد وزنی/ وزنی و مقدار کونژوگه‌ها طوری محاسبه شد که در تمامی نمونه‌ها 0/4 درصد پروتئین وجود دارد. الف) کونژوگه ایزوله پروتئین‌های سرمی–بخش محلول صمغ فارسی، ب) کونژوگه کازئینات سدیم–بخش محلول صمغ فارسی، ج) کونژوگه ایزوله پروتئین‌های سرمی–تراگاکانتین و د) کونژوگه کازئینات سدیم–تراگاکانتین. در این شکل: □ پ‌هاش 3، ■ pH 5 و ⊡ پ‌هاش 7.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که در ایجاد کونژوگه پروتئین‌های شیر–بخش محلول صمغ‌های بومی هرچه مدت زمان حرارت‌دهی بیشتر و نسبت بسیارقندی: پروتئین کمتر باشد پیشرفت واکنش میلارد (به‌ویژه در مورد پروتئین‌های شیر–بخش محلول صمغ فارسی) بیشتر بود. پیشرفت واکنش میلارد به روش خشک در تراگاکانتین در مقایسه با بخش محلول صمغ فارسی کمتر بود که علت آن احتمالا وجود شاخه‌های جانبی، وزن مولکولی بیشتر و ساختار سفت تراگاکانتین است که از طریق دافعه فضایی و عدم انعطاف‌پذیری از اتصال‌های بعدی بین پروتئین و بسیارقندی جلوگیری نموده است. کونژوگه‌های پروتئین‌های شیر–بخش محلول صمغ‌های بومی قادر به پایدارکردن امولسیون‌ها نبودند که علت آن ممکن است به همگن‌سازی با امواج فراصوت، شکستن ساختار بسیارقندی یا اتصال ایجاد شده بین پروتئین و بسیارقندی بوده باشد. همچنین، احتمالا بسیارقندی از

طریق محبوس کردن پروتئین و ایجاد ممانعت فضایی، سبب از دسترس خارج شدن گروه‌های آب‌گریز پروتئین برای اتصال به مولکول‌های روغن شده است.

منابع

صادقیان، ع.، کدخدایی، ر.، فرهوش، ر.، کوچکی، آ. و نجف نجفی، م.، 1392، بررسی تاثیر کونژوگه پروتئین آب پنیر–نشاسته بر شاخص‌های کیفی امولسیون روغن در آب، نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی، 2، 139–152.

Abbasi, S. & Rahimi, S., 2015, Persian Gum. In S. Mishra (Ed.), Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials, *Taylor & Francis Group* LLC. USA

Akhtar, M. & Dickinson, E., 2003, Emulsifying properties of whey protein–dextran conjugates at low pH and different salt concentrations. Colloids and Surfaces B: *Biointerfaces*, 31, 125–132.

Al-Hakkak, J. & Al-Hakkak, F., 2010, Functional egg white–pectin conjugates prepared by controlled Maillard reaction. *Journal of Food Engineering*, 100, 152–159.

Azarikia, F. & Abbasi, S., 2010, On the Stabilization Mechanism of Doogh (Iranian yoghurt drink) by Gum Tragacanth. *Food Hydrocolloids*, 24, 358–363.

Azarikia, F. & Abbasi, S., 2016, Efficacy of whey protein–tragacanth on stabilization of oil-in-water emulsions: Comparison of mixed and layer by layer methods. *Food Hydrocolloids*, 59, 26–34.

Balaghi, S., Mohammadifar, M. A., & Zargaraan, A., 2010, Physicochemical and rheological characterization of gum tragacanth exudates from six species of Iranian Astragalus. *Food Biophysics*, 5, 59–71.

Cheetangdee, N. & Fukada, K., 2014, Emulsifying activity of bovine β-lactoglobulin conjugated with hexoses through the Maillard reaction. Colloids and Surfaces A: *Physicochemical and Engineering Aspects*, 450, 148–155.

Chen, H., Jin, Y., Ding, X., Wu, F., Bashri, M., Chen, F., Cui, Z. & Xu, X., 2014, Improved the emulsion stability of phosvitin from hen egg yolk against different pH by the covalent attachment with dextran. *Food Hydrocolloids*, 39, 104–112.

Chung, C., Rojanasasithara, T., Mutilangi, W. & McClements, D. J., 2015, Enhanced stability of anthocyanin-based color in model beverage systems through whey protein isolate complexation. *Food Research International*, 76, 761–768.

Dickinson, E. & Semenova, M. G., 1992, Emulsifying properties of covalent protein–dextran hybrids. *Colloids and Surfaces*, 64, 299–310.

Doi, E., Shibata, D. & Matoba, T., 1981, Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. *Analytical Biochemistry*, 118, 173–184.

Dunlap, C. A. & Cote, G. L., 2005, β-Lactoglobulin–dextran conjugates: Effect of polysaccharide size on emulsion stability. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 53, 419–423.

Ettelaie, R. & Akinshina, A., 2014, Colloidal interactions induced by overlap of mixed protein + polysaccharide interfacial layers. *Food Hydrocolloids*, 42, 106–117.

Fadavi, G., Mohammadifar, M. A., Zargarran, A., Mortazavian, A. M. & Komeili, R., 2014, Composition and physicochemical properties of Zedo gum exudates from Amygdalus scoparia. *Carbohydrate Polymers*, 30, 1074–1080.

Golkar, A., Nasirpour, A., Keramat, J. & Desobry, S., 2015, Emulsifying properties of Angum gum (Amygdalus scoparia Spach) conjugated to β-Lactoglobulin through Maillard-type reaction. *International Journal of Food Properties*, 18, 2042–2055.

Guan, Y. G., Lin, H., Han, Z., Wang, J., Yu, S. J., Zeng, X., Liu, Y. Y., Xu, C. H. & Sun, W. W., 2010, Effects of pulsed electric field treatment on a bovine serum albumin–dextran model system, a means of promoting the Maillard reaction. *Food Chemistry*, 123, 275–280.

Hoagland, P. D., Fishman, M. L., Konja, G. & Clauss, E., 1993, Size exclusion chromatography with viscosity detection of complex polysaccharides: Component analysis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 41, 1274–1281.

Jimenez-Castano, L., Villamiel, M. & Lopez-Fandino, R., 2007, Glycosylation of individual whey proteins by Maillard reaction using dextran of different molecular mass. *Food Hydrocolloids*, 21, 433–443.

Kato, A., 2002, Industrial applications of Maillard-type protein–polysaccharide conjugates. *Food Science and Technology Research*, 8, 193–199.

Koshani, R., Aminlari, M., Niakosari, M., Farahnaky, A., & Mesbahi, G., 2015, Production and properties of tragacanthin–conjugated lysozyme as a new multifunctional biopolymer. *Food Hydrocolloids*, 47, 69–78.

Li, C., Wang, J., Shi, J., Huang, X., Peng, Q. & Xue, F., 2015, Encapsulation of tomato oleoresin using soy protein isolate–gum aracia conjugates as emulsifier and coatig materials. *Food Hydrocolloids*, 45, 301–308.

Li, Y., Lu, F., Luo, C., Chen, Z., Mao, J., Shoemaker, C. F. & Zhong, F., 2009, Functional properties of the Maillard reaction products of rice protein with sugar. *Food Chemistry*, 117, 69–74.

Li, Y., Zhong, F., Ji, W., Yokoyama, W., Shoemaker, C. F., Zhu, S. & Xia, W., 2013, Functional properties of Maillard

reaction products of rice protein hydrolysates with mono-, oligo- and polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 30, 53–60.

Lievonen, S. M., Laaksonen, T. J. & Roos, T. H., 2002, Nonenzymatic browning in food models in the vicinity of the glass transition: effects of fructose, glucose, and xylose as reducing sugar. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 7034–7041.

Liu, J., Ru, Q. & Ding, Y., 2012, Glycation a promising method for food protein modification: Physicochemical properties and structure, a review. *Food Research International*, 49, 170–183.

McClements, D. J., 2005, Food emulsions: Principles, practice, and techniques (2nd ed.). Boca Raton: CRC Press.

Mohammadifar, M. A., Musavi, S. M., Kiumarsi, A. & Williamas, P. 2006. Solution properties of targacanthin (water-soluble part of gum tragacanth exudate from *Astragalus gossypinus*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 38: 31–39.

Muppalla, S. R., Sonavale, R., Chawla, S. P. & Sharma, A. 2012. Functional properties of nisin–carbohydrate conjugates formed by radiation induced Maillard reaction. *Radiation Physics and Chemistry*, 81: 1917–1922.

Neirynck, N., van der Meeren, P., Bayarri Gorbe, S., Dierckx, S. & Dewettinck, K., 2004, Improved emulsion stabilizing properties of whey protein isolate by conjugation with pectins. *Food Hydrocolloids*, 18, 949–957.

O'Regan, J. & Mulvihill, D. M. 2009. Preparation, characterisation and selected functional properties of sodium caseinate–maltodextrin conjugates. *Food Chemistry*, 115: 1257–1267.

Tischer, C. A., Iacomini, M. & Gorin, P. A. J. 2002. Structure of the arabinogalactan from gum tragacanth (*Astralagus gummifer*). *Carbohydrate Research*, 337: 1647–1655.

Wang, Q. & Ismail, B. 2012. Effect of Maillard-induced glycosylation on the nutritional quality, solubility, thermal stability and molecular configuration of whey protein. *International Dairy Journal*, 25: 112–122.

Weiping, W. & Branwell, A. 2000. Tragacanth and Karaya. In: G.O. Phillips & Williams, P.A. (Eds.). Handbook of Hydrocolloids. Cambridge: *Woodhead publishing* Ltd., pp, 231–246.

Wong, B. T., Day, L. & Augustin, M. A. 2011. Deamidated wheat protein–dextran Maillard conjugates: Effect of size and location of polysaccharide conjugated on steric stabilization of emulsions at acidic pH. *Food Hydrocolloids*, 25: 1424–1432.

Wooster, T. J. & Augustin, M. A. 2006. β-Lactoglobulin–dextran Maillard conjugates: Their effect on interfacial thickness and emulsion stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, 303: 564–572.

Wooster, T. J. & Augustin, M. A. 2007. The emulsion flocculation stability of protein–carbohydrate diblock copolymers. *Journal of Colloid and Interface Science*, 313: 665–675.

Xu, C. H., Yang, X. Q. Yu, S. J., Qi, J. R., Guo, R., Sun, W. W., Yao, Y. J. & Zhao, M. M. 2010. The effect of glycosylation with dextran chains of differing lengths on the thermal aggregation of β-conglycinin and glycinin. *Food Research International*, 43: 2270–2276.

Xu, D., Wang, X., Jiang, J., Yuan, F. & Gao, Y. 2012. Impact of whey protein–beet pectin conjugation on the physicochemical stability of β-carotene emulsions. *Food hydrocolloids*, 28: 258–266.

Yadav, M. P., Parris, N., Johnston, D. B. Onwulata, C. I. & Hicks, K. B. 2010. Corn fiber gum and milk protein conjugates with improved emulsion stability. *Carbohydrate Polymers*, 81: 476–483.

Yang, Y., Cui, S., Gong, J., Miller, S. S., Wang, Q. & Hua, Y., 2015, Stability of citral in oil-in-water emulsions protected by a soy protein–polysaccharide Maillard reaction product. *Food Research International*, 69, 357–363.

Zhu, D., Damodaran, S. & Lucey, J. A., 2010, Physicochemical and emulsifying properties of whey protein isolate (WPI)–dextran conjugates produced in aqueous solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 2988–2994.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 13, No. 5, Dec- Jan 2018, p. 744-758

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 13، شماره 5، آذر - دی 1396، ص. 758-744

Optimization of milk proteins–soluble fraction of Iranian native gums conjugate formation via the Maillard reaction

F. Azarikia[1], Soleiman Abbasi[2*]

Received: 2016.04.19
Accepted: 2016.10.13

Introduction: Maillard reaction is a well-known technique for covalent coupling of protein–polysaccharide which is usually used to improve the functional properties of proteins. Conjugation by the dry heating method is occurred during Amadori rearrangement step in the Maillard reaction where amine groups of the proteins are linked to the reducing end of the polysaccharides. This glycation process leads to the improvement of solubility, foaming and emulsifying properties of proteins (Liu *et al*., 2012). Protein-based emulsions are sensitive to pH and ionic strength alterations as well as heating and freezing–thawing processes. While, joining proteins to high molecular weight polysaccharides protects them against environmental stresses. A wide range of carbohydrates were already utilized to enhance the emulsifying properties of proteins–polysaccharides namely whey protein isolate–dextran (Akhtar *et al*., 2003), *β*-lactoglobulin–dextran (Wooster *et al.*, 2006), sodium caseinate–maltodextrin (O'Regan *et al.*, 2009), deamidated wheat protein–maltodextrin or glucose (Wong *et al.*, 2011), whey protein isolate–pectin (Xu *et al.*, 2012), yolk phosvitin–dextran (Chen *et al.*, 2014), *β*-lactoglobulin–six-carbon monosaccharides (Cheetangdee *et al.*, 2014), soy protein isolate–soy soluble polysaccharides (Yang *et al.*, 2015), lysozyme–tragacanth (Koshani *et al.*, 2015), and *β*-lactoglobulin–Persian gum (Golkar *et al.*, 2015). However, based on the existing literature, it seems that conjugation of Iranian native gums and proteins needs to be more attended to show their potential applications. Therefore, in this study, conjugate formation between milk proteins (sodium caseinate and whey protein isolate) and soluble fraction of Iranian native gums (gum tragacanth and Persian gum) was optimized using response surface methodology (RSM) and the resulting conjugates were used in emulsion formulation in order to compare protein capability before and after being attached to the gums.

Materials and methods: Iranian native gums were pulverized and sieved (mesh size < 60) after being prepared from local herbal stores. To obtain protein–polysaccharide conjugates, dry heat treatment was accomplished at 60°C and 79% relative humidity at different protein:polysaccharide ratios and heating times. Free amino group content was determined by the ninhydrin method described by Doi et al. (1981). To measure color changes before and after Maillard reaction, Hunter Lab was used. Besides, possibility of stabilizing oil-in-water emulsions using the conjugates was studied. Emulsions were formed by addition of oil phase (4% w/w) into protein–polysaccharide conjugates solution (0.4% w/w) following by ultrasound treatment (amplitude of 100%, for 4 min). Samples were kept at 4 °C for 30 days after adjusting the pH at 3, 5 and 7 to compare the effect of protein–polysaccharide conjugates on their stability at different protein charges. For optimization of Maillard reaction using RSM (central composite design), protein:polysaccharide ratio and heating time were selected as independent variable and were studied at 5 levels. The dependent variables were the substitution degree of free amino groups and color change.

Results & Discussion: Based on our findings, the decrease of free amino group indicated that NH_2 group of amino acids in milk proteins was covalently linked to carbonyl group of the gums. Comparing free amino group reduction of the samples containing soluble fraction of gum tragacanth and Persian gum also showed that Persian gum was more capable of forming covalent linkage with milk proteins than gum tragacanth; probably, due to the lower side branches of Persian, its molecular weight as well as its structural flexibility. Moreover, we believe the higher side branches of attached-tragacanthin molecules might prevent further attachment of protein to the other polysaccharide molecules via steric repulsion. According to the results of color measurement before and after dry Maillard reaction, conjugation led to reduction of L^* and increase of a^* and b^*. In addition, higher heating time and protein:polysaccharide ratio caused progress of Maillard reaction (especially in the case of milk proteins–soluble fraction of Persian gum). Based on our findings, in dry Maillard reaction, the optimum heating time and protein:polysaccharide ratio were 8 days and 1:1.59 for whey protein isolate–soluble fraction of Persian gum, 7 h and 1:2 for sodium caseinate–soluble fraction of Persian gum, 13.64 days and 1:3 for whey protein isolate–soluble fraction of gum tragacanth, and 7.82 h and 1:3 for sodium

1 and 2. Former PhD student and Professor, Colloids and Rheology Lab., Department of Food Science & Technology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, P.O. Box 14115-336, Tehran, Iran.
(*Corresponding Author: sabbasifood@modares.ac.ir)

caseinate–soluble fraction of gum tragacanth, respectively. Besides, the obtained Maillard reaction products did not cause complete stability of emulsions at pHs 3, 5 and 7. Our findings also declared that attachment of polysaccharides to proteins might negatively affect the proteins functionality, as emulsifier, possibly by hindering adsorption of hydrophobic groups of proteins to oil droplets. Furthermore, homogenization process during emulsion preparation using ultrasound could break the formed covalent bonds and polysaccharide structure leading to lower steric repulsion and viscosity.

Key words: Milk proteins, Maillard reaction, Tragacanth, Persian gum